



Overvågning af influenza A virus i svin - Slutrapport 2015

Krog, Jesper Schak; Hjulsager, Charlotte Kristiane; Larsen, Lars Erik

Publication date:
2016

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link back to DTU Orbit](#)

Citation (APA):
Krog, J. S., Hjulsager, C. K., & Larsen, L. E. (2016). *Overvågning af influenza A virus i svin - Slutrapport 2015*. DTU Veterinærinstituttet.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Overvågning af influenza A virus i svin

SLUTRAPPORT 2015

Offentlig udgave



Jesper Schak Krog
Charlotte Kristiane Hjulsager
Lars Erik Larsen

Forord

Denne rapport beskriver resultaterne af overvågning af influenza i svin i Danmark i 2015 og sammenholder resultaterne med dem fra de foregående år og udenlandske studier. Laboratorieundersøgelser og databehandling er udført på DTU Veterinærinstituttet. Indledende screening af prøver for tilstedeværelsen af influenza A virus er betalt af indsenderne, mens de øvrige analyser er finansieret af FVST's overvågningsprogram. Slutrapporten er den endelige opgørelse af analyserede indsendelser for det pågældende år. Der kan være mindre afvigelser mellem slutrapport og kvartalsrapporterne.

Definitioner

Influenzavirus har et RNA genom, der er fordelt på 8 segmenter, som hvert indeholder minimum et gen, der koder for influenzavirusproteiner. Ud over HA og NA generne, der bestemmer subtypen af influenzavirus, er det vigtigt også at kende de øvrige såkaldte interne gener, da disse er med til at bestemme virulens og værtsspecificitet af et givent influenzavirus. For at kunne karakterisere alle gensegmenterne fra et virus er det mest optimalt at udføre sekvensanalyse på et dyrket virus isolat, da primær materialet (væv, spyt og næsesvabere) potentielt kan indeholde flere forskellige virus, og det da ikke kan afgøres hvordan sekvenser fra segmenterne "hører sammen".

Hvis to influenzavirus inficerer den samme celle samtidigt, kan et ny virus opstå ved at de 8 gensegmenter kombineres på en ny måde i virusafkommet fra den pågældende celle. Et sådant virus kaldes et reassortment.

For at lette læsningen af rapporten vil der i det følgende gives en beskrivelse af de influenzatyper og gensegmenter rapporten indeholder. Denne nomenklatur vil blive benyttet konsekvent gennem rapporten.

<u>H1N1</u>	"Avian-like" swine H1N1. Opstod ved en introduktion af et helt virus til svin fra fugle i slut 70'erne/start 80'erne i Europa. Dette virus blev påvist første gang i Danmark i 1981.
<u>H3N2</u>	"Svine H3N2". Stammer fra det humane H3N2 oprindeligt fra Hong Kong influenzaen 1968, der adapterede til svin og i 1984 reassorterede og tog de interne gener fra "avian-like" swine H1N1. Dette virus blev påvist første gang i Danmark i 1990.
<u>H1N2</u>	"H1N2dk". Virus med det samme "avian-like" swine H1 og "avian-like" swine interne gener, men med N2 fra dansk svine H3N2. Dette blev påvist første gang i Danmark 2003.
<u>H1N1pdm09</u>	Virus der i 2009 forårsagede en human influenza pandemi oprindeligt fra Mexico. HA, NA og de interne gener er forskellige fra de andre enzootiske subtyper.

<u>H1pdm09</u>	Virus med det specifikke HA fra H1N1pdm09.
<u>H1</u>	HA gen fra avian-like H1N1.
<u>N2sw</u>	NA gen fra ”swine” H3N2 og H1N2dk.
<u>N2hu</u>	NA gen beslægtet med NA-genet i H3N2 humant sæson virus, der cirkulerede i mennesker i midten af 90’erne.
<u>H3hu05</u>	HA gen beslægtet med HA-genet fra den humane sæsoninfluenza H3N2 i 2004-5. Det er forskelligt fra HA genet i svine H3N2.

Opsummering og konklusion

Der er i 2015 gennemført en systematisk, prospektiv, passiv overvågning af cirkulerende influenzavirus subtyper i danske svin. Det overordnede formål med overvågningen var, at identificere hvilke influenzavirus subtyper og stammer, der cirkulerer blandt danske svin, og at kortlægge sygdomsårsager i svinepopulationen med henblik på at sikre det strategiske mål: at mindske antibiotikaforbruget i danske svinebesætninger.

Overvågningen bestod i:

- 1) Undersøgelse for influenzavirus vha. pan-influenza A virus real time RT-PCR på brugerbetalte diagnostiske indsendelser til influenzavirusundersøgelse på DTU-VET
- 2) Test af influenzavirus positive prøver for pandemisk H1N1 (H1N1pdm09) ved real time RT-PCR der specifikt detekterer HA-genet i H1N1pdm09 virus
- 3) Isolation af virus i MDCK celler
- 4) Implementering af ny metode til subtypning af influenza, baseret på real time PCR i stedet for sekventering.
- 5) Subtypning af indsendelser ved real time PCR (HA og NA generne)
- 6) Komplet genom karakterisering af udvalgte virusisolater

Der blev totalt i 2015 iværksat undersøgelse for influenza A virus på 1359 prøver fordelt på 608 indsendelser fra 488 besætninger. I alt havde 286 (47 %) af indsendelserne minimum en positiv prøve, disse repræsenterede 256 forskellige besætninger. Indsendelserne fordelte sig over hele landet og over hele året. Der var flest indsendelser til undersøgelse i de kolde måneder, men influenza virus blev påvist med næsten samme hyppighed hele året.

I alt blev 176 influenzavirus positive indsendelser subtypet vha. real time RT-PCR. Disse analyser viste, at de to mest almindelige subtyper i danske svin i 2015 var den danske variant af H1N2 og H1N1pdm09. Prævalensen af det almindelige svineinfluenzavirus "avian-like swine" H1N1 var ligesom i 2014 meget lav. Influenzavirus af subtypen H3N2, der har cirkuleret i Danmark siden 1990, men med meget lav prævalens de senere år, blev ikke påvist i 2015. Den centraleuropæiske variant af H1N2, der har et human-like HA gen, er aldrig påvist i danske svin.

Virus med subtypen H1pdm09 blev påvist i 75 indsendelser fra 66 besætninger og udgjorde således 26 % af de influenzavirus positive indsendelser. Dette er på niveau med 2014. Hos mennesker var der i 2015 en meget lige blanding af H1N1pdm09 og H3N2 subtyperne, mens der i 2014, hvor der skete en drastisk stigning af H1pdm09 i svin, var fuldstændig dominans af H1N1pdm09 i mennesker.

Resultaterne af overvågningen i 2015 underbygger antagelsen om at de nye reassortments fra de foregående år: H1N2hu, H1pdmN2hu og H1pdmN2sw, nu er fast etableret i de danske

svinebesætninger. Det var særligt interessant i 2015 at se, at den nye reassortment, H3hu05N2sw, blev påvist i 5 indsendelser. Disse 5 indsendelser var geografisk distribueret over hele landet, kun en af indsendelserne var fra en besætning, der også blev fundet positiv for dette virus i 2014. Det interessante ved dette virus er, at det er en triple-reassortment, hvor alle de interne gener stammer fra H1N1pdm09 subtypen, mens N2 stammer fra H3N2/H1N2 fra svin, og H3 er af human oprindelse. Da HA genet har cirkuleret i den humane befolkning for nylig (omkring 2005), må det formodes at der er stor grad af immunitet i den humane population mod denne type. Derimod må det formodes at hele den danske svinepopulation vil være naiv, da vaccinen ikke umiddelbart udviser nogen beskyttelse mod dette virus.

Resultaterne, der er beskrevet i rapporten, er vigtige i forhold til såvel zoonotiske som veterinære aspekter ved influenza A virus infektion i svin i Danmark. Undersøgelserne har med stor sandsynlighed vist, at H1N1pdm09, som stadig må betragtes som en zoonose, nu er etableret i den danske svinepopulation, hvor den cirkulerer uafhængigt af den humane influenzavirusæson. Overvågningen har endvidere påvist adskillige nye virus reassortments, hvor gener fra H1N1pdm09 indgår. Bl.a. tyder det på, at H1N2 virus med interne gener fra H1N1pdm09 har etableret sig i den danske svine population. Der er global bevågenhed omkring svineinflenzavirus med interne gener fra H1N1pdm09, da der i flere tilfælde er vist smitte med sådanne virus til mennesker, fx H3N2v i USA. Overvågningen har også bidraget til, at vi tidligt har påvist et nyt virus med zoonotisk potentiale som H3hu05N2sw. Dette betyder, at der kan foretages en nærmere genetisk og biologisk karakterisering af dette virus, hvilket kan danne evidens-baseret baggrundsviden for risikohåndteringen, i det tilfælde at der konstateres human smitte med dette virus. Den fremtidige overvågning vil bl.a. have fokus på at undersøge, om dette virus bliver etableret i danske svin.

Fra et veterinært synspunkt er det vigtigt at få fastlagt hvilke(n) subtype(r), der cirkulerer i besætningen, da valg af vaccine er afhængig af denne information. Det er derfor positivt, at der over de senere år er sket en stigning i antal indsendelser til influenzapåvisning i Danmark, da det øger muligheden for at vaccinere korrekt og derved nedbringe risikoen for antibiotika krævende sekundære infektioner. Det er også positivt at den H1N2 subtype (med human-like HA-gen), der er dominerende i andre dele af Europa, stadig ikke findes i Danmark. Introduktion af dette virus kan frygtes at få epizootisk karakter, da immuniteten i populationen mod dette virus er meget lille.

Det kan konkluderes, at den iværksatte overvågning har givet et godt indblik i hvilke influenza A virus, der cirkulerer i danske svin, og at denne information dagligt bruges proaktivt ved håndtering af sygdom i danske svinebesætninger. Overvågningen har endvidere vist, at virus med nye gen kombinationer er blevet etableret i danske svin, og der bør de kommende år holdes øje med, om disse virus smitter til mennesker.

INDHOLDSFORTEGNELSE

Forord	2
Definitioner	2
Opsummering og konklusion	4
Indledning.....	7
Formål	9
Resultater.....	10
Indsendelser.....	10
Indsendelser med påvist influenza A virus	11
Ny metode til subtypning	11
Svineinflenzavirus subtyper	12
Svineinflenzavirus reassortments	14
Dobbelt-infektioner og skiftende subtyper i besætningerne.	15
Resistens og virulens markører	15
Samlet analyseoversigt	15
Diskussion	17
Veterinære aspekter.....	18
Zoonotiske aspekter.....	18
Bilag 1. HA fylogeni	20
Bilag 2. NA fylogeni	20
Bilag 3. Fuld genom data	22
Bilag 4. Geografisk fordeling af positive og negative indsendelser	24
Bilag 5. Geografisk fordeling af H1N1pdm09 virus.....	25
Bilag 6. Geografisk fordeling af subtyper	26

Indledning

Influenza i dyr udgør en trussel mod dyresundheden, dyrevelfærden, produktionsøkonomien, fødevarer sikkerheden og har givet anledning til flere pandemier i mennesker. For at kunne agere hurtigt på nye trusler (early warning) og derved holde konsekvenser ved fund af et nyt virus på et minimum, er det nødvendigt, at virologiske og epidemiologiske informationer om cirkulerende influenzavirus udveksles hurtigt og effektivt mellem sundhedsmyndigheder og veterinærmyndigheder både nationalt og internationalt. Nye og/eller ændrede influenzavirus, der har potentiale til at kunne smitte mennesker (zoonoser), opstår oftest i det animale reservoir. Derfor er det oplagt, at der indenfor det veterinære område implementeres effektive systemer til overvågning og karakterisering af influenzavirus i relevante dyrearter. Det danske overvågningsprogram for influenza i svin bygger på anbefalinger vedr. overvågning for influenza beskrevet af OIE¹, FAO² samt EFSA³.

Der er globalt identificeret utallige varianter af forskellige cirkulerende svineinfluenza subtyper (kombinationer af HA og NA gener). I Europa og Danmark cirkulerer der for tiden flere forskellige subtyper, der kan betragtes som enzootiske. Herudover er der adskillige rapporter om sporadiske fund af andre influenzavirus i svin, som indeholder gener fra fugle-, menneske- og enzootiske svineinfluenzavirus. Svin betragtes derfor som et reservoir for influenzavirus og for influenzavirusgener, der kan indgå i nye influenzavirus, som potentielt kan smitte mennesker.

Influenza er en almindelig sygdom blandt svin i Danmark, idet mere end 90 % af danske svinebesætninger har influenza antistofpositive svin. Fire subtyper af svineinfluenzavirus kan betragtes som enzootiske i danske svin. H1N1, H1N2 og H3N2 som har cirkuleret de sidste 15-35 år, samt H1N1pdm09 virus, der var pandemisk i mennesker i 2009, og første gang blev påvist i danske svin i 2010. Influenzainfektioner hos svin er oftest ukomplicerede, med en varighed på 4-6 dage og kan ikke behandles med antibiotika. Det er en lokal infektion i luftvejene samt eventuelt i tarmkanalen, og findes således ikke i kødet. Dyr som er akut syge af influenza må ikke sendes til slagtning. Sygdommen forværres imidlertid af sekundære bakterielle infektioner, som ofte behandles med antibiotika.

Fund af influenzavirus i svin er ikke anmeldepligtige i EU, herunder Danmark, med mindre det drejer sig om subtyperne H5 og H7, og disse er ikke påvist i EU. Besætninger med udbrud af influenza hos svin pålægges derfor ikke restriktioner af myndighederne. Diagnostik af influenza A virus i danske svin foretages på materiale, der indsendes direkte til DTU Veterinærinstituttet eller via SEGES Laboratorium for Svinesygdomme i Kjellerup, i forbindelse med almindelig rutinediagnostik, samt på udenlandske laboratorier. Resultater af sidstnævnte er ikke tilgængelige for forfatterne af denne rapport. Influenzavirus i mennesker kommer formodentligt oprindeligt fra dyr. Influenzavirus kan i nogle tilfælde smitte mennesker direkte fra fugle (eksempelvis H5N1 og H7N7), hvilket kan give en infektion med dødelig udgang, men fugleinfluenzavirus smitter generelt dårligt til mennesker. Svineinfluenzavirus er tættere relateret til de humane influenzavirus end fugleinfluenzavirus er. Hvis et svineinfluenzavirus kan give anledning til smitte mellem mennesker, er der risiko for udvikling af en ny

¹ <http://www.fao.org/docrep/012/ak738e/ak738e00.pdf> (FAO guidelines for surveillance of pandemic H1N1/2009 and other influenza viruses in swine populations)

² <http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/publications/pdf/OFFLUSurveillance.pdf> (OFFLU strategy document for surveillance and monitoring of influenzas in animals)

³ <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1770.pdf> (Scientific Opinion on the pandemic (H1N1) 2009 influenza and its potential implications for animal health)

influenzapandemi. Pandemien i 2009 er et eksempel herpå. Det er derfor vigtigt i relation til den humane sundhed at vide hvilke virus, der cirkulerer i svin.

¹ <http://www.fao.org/docrep/012/ak738e/ak738e00.pdf> (FAO guidelines for surveillance of pandemic H1N1/2009 and other influenza viruses in swine populations)

² <http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/publications/pdf/OFFLUsurveillance.pdf> (OFFLU strategy document for surveillance and monitoring of influenzas in animals)

³ <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1770.pdf> (Scientific Opinion on the pandemic (H1N1) 2009 influenza and its potential implications for animal health)

Formål

Det overordnede formål med overvågningen var:

- At undersøge hvilke influenzatyper og influenzavirus gener, der cirkulerer blandt danske svin.
- At kortlægge sygdomsårsager i svinepopulationen med henblik på at sikre det strategiske mål: at mindske antibiotikaforbruget i danske svinebesætninger.

Desuden blev nedenstående aspekter belyst:

Zoonotiske aspekter

1. Tidlig påvisning af molekulære markører, der indikerer øget risiko for human smitte, i de cirkulerende virus.
2. Tidlig påvisning af virus, som indeholder genetiske markører, der indikerer at de er resistente overfor antivirale midler.
3. Identifikation af genetiske ændringer i cirkulerende influenzavirus øger muligheden for at forberede effektive diagnostiske tests og beskyttende vacciner, hvis der sker smitte til mennesker.

Veterinære aspekter

1. At opnå en bedre forståelse af den komplekse epidemiologi af svineinflenzavirus under danske forhold.
2. At muliggøre en tidlig etablering af virus stocks til hurtig produktion af vacciner mod nye virus subtyper, der giver forøget sygdom i svin.
3. At sikre at de i landet anvendte diagnostiske tests fanger alle kendte svineinflenzavirus stammer.
4. At kunne dokumentere, specielt overfor eksportmarkeder, hvilke svineinflenzavirus stammer der er til stede i Danmark – dette er specielt relevant i de tilfælde, hvor nye virus opdages i svin andre steder i verden/Europa.
5. Bidrage til at der opnås et fælles europæisk overblik over cirkulerende influenzavirus i svin.

Overvågningen i 2015 er udført anderledes end tidligere år, da en ny metode til at subtype influenza blev taget i brug. Overvågningen bestod af:

1. Subtypning (HA og NA subtype) af influenzavirus fundet i indsendelser til influenza undersøgelse på DTU-VET. I 2015 blev en ny metode implementeret, hvor der blev anvendt real time RT-PCR assays, som var specifikke for de enkelte varianter af HA og NA kendt fra tidligere års overvågning.
2. Test af influenzaviruspositive prøver for H1N1pdm09 ved real time RT-PCR der er specifik for HA-genet i H1N1pdm09 virus.
3. Sekvensanalyse af HA og NA generne på udvalgte prøver
4. Fuld genom karakterisering af udvalgte virusisolater.

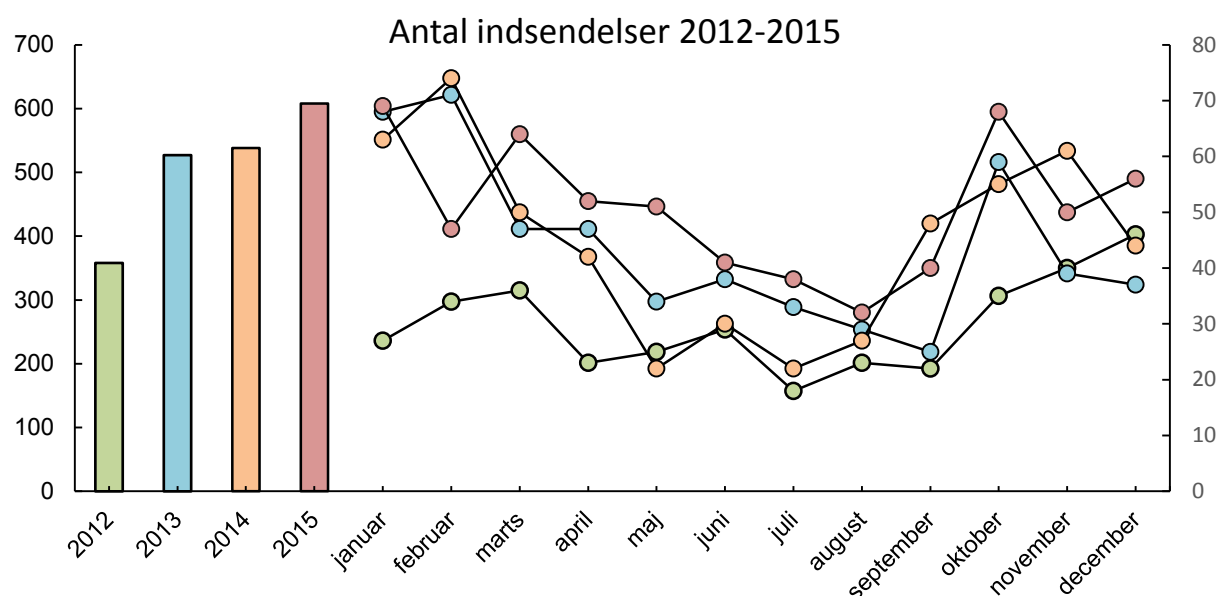
Resultater

Indsendelser

Alle indsendelser fra danske svinebesætninger til DTU Veterinærinstituttet med ønske om undersøgelse for influenzavirus blev testet og indgår i rapporten. Prøverne er udtaget fra svin med anamnesen respirationsvejslidelse. Omkostningerne til influenzaviruspåvisning, der foretages med real time RT-PCR, er løbende faktureret de indsendende dyrlæger. Typisk er der indsendt og testet 1-3 prøver per indsendelse. Prøvematerialet er lungevæv, næsesvabere eller sput. Nogle besætninger har indsendt prøver mere end en gang i løbet af året.

I 2015 blev der totalt modtaget 1359 prøver fordelt på 608 indsendelser til undersøgelse for influenza A virus fra danske svinebesætninger fordelt over hele landet (se Bilag 4 Anonymt i denne udgave).

Antallet af indsendelser til influenzavirusundersøgelse i årene 2012 til 2015 fremgår af Figur 1. Den månedlige fordeling af indsendelser for hvert af de fire år fremgår ligeledes af Figur 1. Antallet af indsendelser i 2015 er endnu engang steget i forhold til tidligere år. I årene 2009-2012 var antallet af indsendelser på samme niveau, mens der var en markant stigning fra 2012 til 2013 (Figur 1). Stigningen var ikke tidsmæssigt sammenfaldende med lovbestemte ændringer i forbindelse med flokmedicinering af svin. Stigningen skyldtes formodentligt en øget opmærksomhed blandt producenter og praktiserende dyrlæger på influenzavirus som årsag til respirationslidelser hos svin. Dette bekræftes af, at der i samme periode skete en stigning i salget af vacciner mod influenzavirus. Stigningen i 2015 er kommet på trods af tilbud om gratis diagnostik på et tysk laboratorium udbudt af vaccineproducenten.

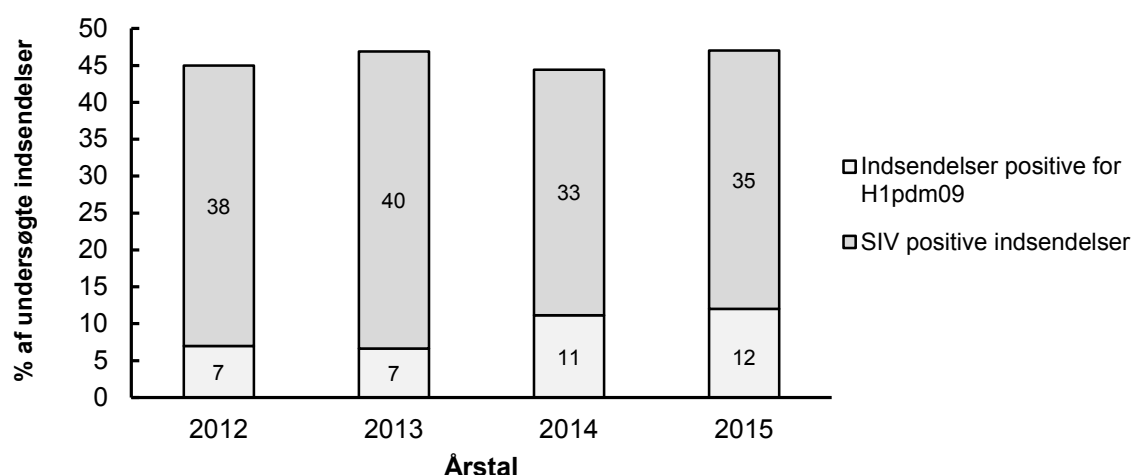


Figur 1. Fordelingen af antallet af indsendelser til diagnostik af influenzavirus i svin fra 2012 til 2015 fordelt på år (søjler til venstre) og måned (graf til højre) med tilsvarende farve.

Indsendelser med påvist influenza A virus

Prøver til undersøgelse for influenza A virus blev først undersøgt med en generel influenza A real time RT-PCR test, som kan genkende alle kendte influenza A virus. I 2015 var i alt 286 indsendelser positive for influenza A virus i minimum 1 prøve, hvilket svarer til 47 % af de 608 undersøgte indsendelser. Det totale antal indsendelser fordelte sig på 488 forskellige besætninger registreret med forskellige CHR-numre, hvoraf 256 fik påvist influenza A virus.

Figur 2 viser hvor mange procent af de undersøgte indsendelser, der i årene 2012 til 2015 blev fundet positive for influenza A virus. Det fremgår af opgørelsen, at andelen af positive prøver de seneste år har stabiliseret sig på omkring 45 %.



Figur 2. Andelen (%) af de undersøgte indsendelser der testede positiv for influenza A virus og andelen der var positiv for H1pdm09 i årene 2012 til 2015.

Der blev fundet positive prøver i alle landsdele (Bilag 4 anonymt i denne udgave), hvilket følger billedet fra de forrige år. Alle prøver fundet positive for influenza A virus blev undersøgt for H1N1pdm09 med en real time RT-PCR analyse, der er specifik for HA-genet i dette virus. I 2015 blev 511 influenza A positive prøver fra 256 besætninger undersøgt for H1N1pdm09, hvoraf 75 (26 %) af indsendelserne var positive, repræsenterende 66 forskellige besætninger (Figur 2). Den geografiske fordeling fremgår af bilag 5 (Anonymt i denne rapport). Af figur 2 fremgår andelen af indsendelser der indeholder H1pdm09, dette omfatter både reassortments hvor H1pdm09 indgår samt indsendelser hvor flere subtyper blev konstateret. Ligesom i 2014 var der et rekord højt antal indsendelser der var positive for H1pdm09.

Ny metode til subtypning

En subtype defineres her ved kombinationen af HA og NA segmenterne. Der tages altså ikke højde for de interne gener, når en subtype angives. I løbet af 2015 er en ny metode til subtypning af influenza blevet udviklet og implementeret i overvågningen. Metoden bygger på real time RT-PCR teknologi, mens der i de foregående år blev brugt sekventering til subtypning. Real time RT-PCR benyttes i vid udstrækning i diagnostik pga. sin høje følsomhed og specificitet, samtidig med at man kan undersøge flere prøver på kortere tid. Der er i 2015 udviklet 8 subtype specifikke RT-PCR assays i samarbejde med europæiske forskningspartnere. De otte assays, der er udviklet, påviser specifikt alle HA og NA varianter kendt fra danske svin. Sensitiviteten er generelt bedre end sekventering som blev benyttet før. Der vil fremadrettet blive arbejdet på

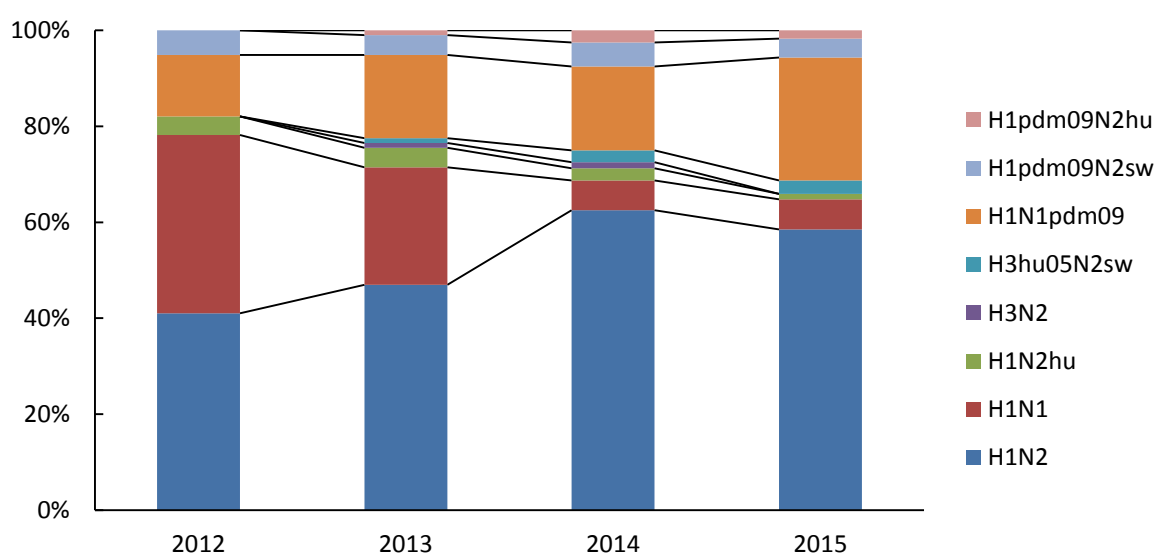
at gøre sensitiviteten endnu bedre, og det er planen at subtypnings analysen på sigt kan rekvireres af de indsendende dyrlæger.

Der er både fordele og ulemper ved brugen af real time RT-PCR fremfor sekventering. De praktiske fordele er, at flere prøver kan analyseres på kortere tid, da analysen er lettere at sætte op og tager meget kortere tid i laboratoriet. Ulempen ved brug af real time RT-PCR er, at der ikke genereres sekvensdata på alle isolater der subtypes. Man kan også være bekymret for ikke at opfange nye subtyper. Her vil man dog formode at de specifikke assays alle vil give et negativt resultat og man vil derfor bruge sekventering i disse situationer, så nye varianter ikke bliver overset.

Svineinfluenzavirus subtyper

I 2015 var 286 indsendelser positive for influenza A virus, og af disse blev subtypen bestemt for 176 forskellige indsendelser svarende til ca. 62 % af de positive indsendelser.

Fordelingen af subtyper i procent ud af det totale antal af subtypedede indsendelser fremgår af Figur 3 for årene 2012-2015. Antallet af indsendelser, der var positive for de forskellige subtyper, er beskrevet i Tabel 1.



Figur 3. Fordeling af subtyper i procent ud af de influenzavirus positive indsendelser for årene 2012-2015.

Tallene fra subtypningen giver ikke et helt reelt billede af fordelingen, da der er bias ved udvælgelsen. I figur 3 udgør de subtyper, hvor H1pdm09 indgår, 31 % af de subtypedede prøver, mens H1pdm09 udgør 26 % af det totale antal af influenzaviruspositive prøver. Fordelingen af subtyper i 2015 er meget lig fordelingen i 2014, idet der er en stærk dominans af H1N2 og H1N1pdm09. H1N1 holder sit lave niveau. Det nye H3hu05N2 virus blev igen påvist, mens H3N2 ikke blev påvist i 2015 hvilket også var tilfældet 2010-2012. Dette betyder at H3N2 kun optræder sporadisk i danske svin. Fordelingen af de øvrige reassortments er nogenlunde konstant.

En detaljeret fordeling af subtyper kan ses i Tabel 1. Den europæiske variant af H1N2, der opstod i England i 90'erne, er fortsat ikke påvist i danske svin. I bilag 6 (Anonymt i denne udgave) er et kort, der viser den geografiske fordelingen af subtyper i Danmark.

Tabel 1. Indsendelser hvor subtypen af influenzavirus blev bestemt ved sekventering af HA og NA gen for årene 2012 til 2014 og real time RT-PCR i 2015. Tallene angiver antallet af subtyper fundet, og en indsendelse, hvor der er fundet to subtyper vil derfor tælle flere steder.

Subtype	Antal				Kommentar
	2015	2014*	2013	2012	
H1N1	11 (6,3 %)	5 (6,3%)	24 (25%)	29 (37%)	"Normal" dansk svineinfluenza A virus subtype "avian-like swine" som har cirkuleret i DK siden 1981.
H1N2	103 (58,5 %)	50 (62,5%)	46 (47%)	32 (42%)	Dansk svineinfluenza A virus subtype fundet første gang i 2003.
H1N2hu	2 (1,1 %)	2 (2,5%)	4 (4%)	3 (4%)	"Normal" dansk svine H1 subtype sammen med human N2 gen. Fundet første gang i danske svin i 2011.
H3N2	0 (0 %)	1 (1,25%)	1 (1%)	0	"Normal" svine H3N2 virus. Ikke detekteret 2010-2012.
H3hu05N2sw	5 (2,8 %)	2 (2,5%)	1** (1%)	0	Ny reassortment med humant H3, der cirkulerede i mennesker i DK 2005, sammen med dansk svine N2
H1N1pdm09	45 (25,6 %)	14 (17,5%)	17 (17%)	10 (13%)	Pandemisk svineinfluenza A virus subtype. Fundet første gang i danske svin januar 2010.
H1pdm09N2sw	7 (4 %)	4 (5%)	4 (4 %)	4 (5 %)	Pandemisk H1 gen sammen med dansk svine N2 gen. Fundet første gang i danske svin i 2011.
H1pdm09N2hu	3 (1,7%)	2 (2,5%)	1 (1%)	0	Pandemisk H1 gen sammen med human N2 gen. Fundet første gang i danske svin i 2011.
Totale antal med HA og NA type	176	80	98	78	
Subtypet for H1pdm09 PCR	75	60	35	25	Pandemisk virus påvist med H1pdm09 specifikt real-time RT-PCR assay.

*Tallet i parentes angiver andelen i procent i forhold til antal subtypedede indsendelser.

** Den nye reassortment blev detekteret retrospektivt i en prøve fra 2013. Den var derfor ikke inkluderet i rapporten i 2013.

Svineinfluenzavirus reassortments

For at undersøge hvilke svineinfluenzavirus stammer der i dag cirkulerer i de danske svin, blev alle gensegmenter fra 20 influenzavirus isolater fra 2015 sekventeret. Oprindelsen af de enkelte gener for de 20 undersøgte svineinfluenzavirus blev identificeret ved sammenligning med gensekvenser i tilgængelige databaser og fremgår af bilag 3. I nedenstående opsummeres resultater for de enkelte subtyper baseret på både screening, subtypning og total gen karakterisering ved sekventering.

H1N2 udgjorde 6 af de 20 sekventerede isolater. Tre af disse havde interne gener identisk med de gener, der findes i de enzootiske svineinfluenza virus (H1N1, H1N2, H3N2). De resterende tre virus havde alle interne gener fra H1N1pdm09 virus og grupperer sig tæt sammen når man sammenholder deres genetiske data for både HA og NA. I det fylogenetiske træ for HA og NA (Bilag 1 og 2) er denne gruppe markeret med ”}”. I træet er inkluderet de isolater af typen H1N2, der blev fuldgennem karakteriseret i 2013. Også disse fordeler sig på samme måde, hvilket kan indikere en enkelt introduktion, der nu cirkulerer blandt besætningerne. Et enkelt isolat med H1N1pdm09 interne gener fra 2013 ligger uden for denne gruppe. Dette indikerer flere reassortments.

H1N1 ”avian-like”-swine. To virusisolater med denne subtype blev karakteriseret ved sekvensanalyse, det ene havde kun interne gener fra enzootiske SIV, mens det andet havde pandemiske interne gener undtagen matrix-genet, der var fra enzootiske svineinfluenza. Den eneste H1N1 reassortment, der tidligere er påvist i Danmark, havde et pandemisk NP. Der er altså stadig ikke set en komplet udskiftning til den pandemiske interne kassette i avian-like swine H1N1.

H1N1pdm09. Fem H1N1pdm09 virus blev karakteriseret ved sekvensanalyse og alle havde udelukkende gener af H1N1pdm09 oprindelse.

H1N2hu. Der blev karakteriseret et enkelt virus af denne type. De interne gener var fra enzootiske svineinfluenza, bortset fra matrix-genet, der var af pandemisk oprindelse. For de fleste af generne inklusiv matrix lå de meget yderligt i deres respektive fylogenetiske grupper. Der er altså her tale om gener, der divergerer signifikant fra de typiske genvarianter.

H1pdmN2hu. Denne subtype blev fundet i prøver fra tre indsendelser fra ialt to besætninger. Et isolat fra hver besætning blev sekventeret og viste at de interne gener alle var af pandemisk oprindelse. Denne reassortment er også påvist i svin i Tyskland i 2011 og er fundet gennem de seneste fire år i Danmark.

H1pdmN2sw. Denne subtype blev fundet i syv indsendelser fra syv forskellige besætninger i 2015. Subtypekombinationen er også blevet fundet udbredt i Tyskland og mere sporadisk i Italien og Holland. Der blev isoleret virus fra tre prøver i 2015. Fuld genom karakterisering

viste, at alle gener, undtagen NA, var identisk med gener fra H1N1pdm09. I Nordvesttyskland er dette virus mere prævalent end det oprindelige H1N1pdm09 virus.

H3hu05N2sw. Subtypen blev identificeret i to besætninger i 2014 og blev endvidere retrospektivt fundet i den ene af disse besætninger i en indsendelse fra 2013. Begge besætninger viste sig at komme fra en region omkring Midtjylland. Overvågningen for 2015 viser, at dette virus nu har spredt sig, da der er positive indsendelser fra Langeland, Østjylland og Nordjylland. Fuldgenom karakterisering af virusset har vist at alle de interne gener er af H1N1pdm09 oprindelse. Der er altså tale om et såkaldt "triple-reassortment", hvor H3 genet har størst lighed med H3 genet fra et humant H3N2 sæson influenzavirus, der cirkulerede i Danmark 2004-2005 og N2 genet har stor lighed med N2 genet fra svine H3N2 og H1N2 subtyperne. Nye reassortments med interne gener fra H1N1pdm09 subtypen er rapporteret fra mange europæiske lande, fra Asien og fra Nordamerika, og i Danmark er der som tidligere nævnt påvist mange H1N2 virus, der ligeledes har skiftet hele den interne gen kassette ud med gener fra H1N1pdm09 virus (Bilag 3).

H3N2. Denne subtype er ikke detekteret i 2013 og kun detekteret to gange de sidste seks år.

Dobbelt-infektioner og skiftende subtyper i besætningerne.

I overvågningen 2015 er der fundet seks indsendelser med mere end én subtype ved real time RT-PCR. I tre af disse blev der fundet flere subtyper i samme prøve, og i de tre andre indsendelser blev der fundet forskellige subtyper i forskellige prøver. Sidstnævnte er markeret med stjerne i bilag 6 (Anonymt i denne udgave). Derudover blev en sag subtypet til H1N1, men da den blev dyrket viste det sig at være H3hu05N2sw. Begge subtyper er derfor i denne prøve, markeret med "a" i Bilag 6 (anonymt i denne udgave).

Resistens og virulens markører

Der er i litteraturen beskrevet en række forskellige mutationer, der giver anledning til resistens overfor Oseltamivir (Tamiflu) og Zanamivir (Relenza), der kan anvendes til antiviral behandling af humane influenzatilfælde. Tilstedeværelsen af mutationerne H274Y og N294S i N1 og R292K og E119G/D/A/V i N2 blev undersøgt i alle NA sekvenser fra 2015. Ingen udviste mutationer, der er relateret til resistens. Derudover blev PB2 generne undersøgt for mutationen E627K der er forbundet med høj virulens. Ingen af isolaterne havde denne mutation.

Samlet analyseoversigt

Tabel 2 viser aktiviteter gennemført i overvågningen af influenza i svin for året 2015 sammenholdt med det planlagte ifølge aftalen for 2015. Til sammenligning er resultaterne for 2014 og 2013 angivet.

Antallet af indsendelser og prøver i 2015 er steget, og det samme er dermed antallet af H1N1pdm09 analyser.

Tabel 2. Samlet oversigt over analyser udført i svineinfluenza overvågning i 2014 sammenlignet med budget og resultaterne for overvågningen i 2012 og 2013.

Parameter	Budget hele 2015	Endelig opgørelse 2015	Endelig opgørelse 2014	Endelig opgørelse 2013
Antal indsendelser undersøgt for influenza A virus	550 ^a	608	538	527
Antal prøver Undersøgt for influenza A virus		1359	1173	1252
Antal indsendelser med min. 1 influenza A virus positiv prøve		286	239	247
Antal influenza A virus positive prøver i alt		511	435	436
Antal prøver testet for H1N1pdm09	450	511	435	436
Antal H1pdm09 positive indsendelser ^b		75	60	35
Antal H1pdm09 positive besætninger		66	55	35
Indsendelser subtypet på både HA og NA	275	176	80 ^d	95 ^d
Resistens undersøgelser ^c	-	20	71	36
Partiel karakterisering alle segmenter	15		18	21
Fuld længde sekventering	10	20	15	16

^aUdgifterne til påvisning af influenza påhviler indsender og er dermed ikke omfattet af aftalen.

^bBaseret på påvisning af HA gen fra H1N1pdm09 med real-time RT-PCR.

^cAnalysen er lavet *in silico* og har derfor ikke haft yderligere omkostninger

^dSubtypet ved sekventering

Diskussion

Benchmarking

Forekomsten af influenza virus i svin i Danmark er undersøgt systematisk over en periode på 6 år, hvorved der er opnået en dynamisk indsigt i hvilke virus, der cirkulerer blandt danske svin. Overordnet set har forekomsten af de forskellige subtyper været relativt stabil med dominans af de enzootiske virus, men introduktionen af H1N1pdm09 har medført dannelsen af en række nye virus med gener fra både dette virus og de enzootiske svineinfluenzavirus, H1N1 og H1N2. H1pdm09N2sw (1. generation eller dobbelt reassortment) er et eksempel på et af disse nye reassortments. I overvågningen 2014 blev der for første gang påvist et 2. generations virus (trippel reassortment), H3hu05N2sw med interne gener fra H1N1pdm09. Overvågningen i 2015 har vist at dette virus har spredt sig yderligere til flere egne af Danmark. Reassortments med H1N1pdm09 gener er også påvist i andre lande i Europa, i Asien og i Nordamerika, hvilket viser, at introduktionen af dette virus har medført en signifikant ændring af influenza virus dynamikken i svin globalt.

Ud fra data i overvågningen kan man se en tendens til at de interne gener fra pandemisk influenza H1N1pdm09 og N2sw vinder frem på bekostning af hhv. "avian-like"-swine interne gener og N1 generne. Det kan betyde at disse yder en fordel for virus. Halvdelen af de H1N2sw vi karakteriserede havde interne pandemiske gener. Det samme har det nye H3hu05N2sw. Alle virus med HA-varianten H1pdm09 viste sig ved hjælp af fuld gen karakterisering at have interne pandemiske gener. N2sw blev påvist i sammenhæng med alle varianter af HA, hvorimod N1 og N1pdm09 altid var sammen med deres respektive parent HA variant.

De seks sekventerede "avian-like" swine H1N1 virus havde ikke pandemiske interne og denne subtype er næsten fortrængt. En mulig årsag hertil er at dette virus bliver udkonkurreret af virus med interne pandemiske gener og N2sw. Tilsvarende er avian-like H1N1 udkonkurreret af en reassortment indeholdende H1pdm09 interne gener og human-like H1N2 HA og NA gener i England. Som nævnt ser det ud til at H3N2 subtypen næsten er forsvundet fra Danmark, da den slet ikke blev påvist i 2010-2012 og kun er fundet i enkelte besætninger i 2013-2014. På tilsvarende vis har human-like H1N2 udkonkurreret H3N2 i flere europæiske lande.

I perioden 2010-2013 har der i regi af et EU projekt (ESNIP3) været gennemført en systematisk udveksling af overvågningsdata i 20 Europæiske lande inklusiv Danmark. Der var ret store forskelle mellem de enkelte lande, men i gennemsnit var 54 % af de karakteriserede virus af subtypen avian-like H1N1, 16 % var H1N2 (human-like som ikke findes i Danmark); 9 % var H3N2 og 14 % var pdm09H1N1.

Udbredelsen af H1N1pdm09 ses altså også i andre lande, men Danmark er anderledes end andre europæiske lande ved fravær af human-like H1N2 og med en høj forekomst af H1N2 med et "avian-like" swine HA gen. Sidstnævnte subtype er de senere år fundet sporadisk i Sverige, Tyskland og Italien.

Veterinære aspekter

I løbet af de sidste tre år er antallet af prøver til undersøgelse for influenzavirus hos svin steget signifikant. I 2015 blev 47 % af indsendelserne fundet positive. Sammenholdt med at hovedparten af indsendelserne er fra besætninger med kliniske respirationsvejssymptomer, understreger det, at influenza hos svin kan have signifikante sundhedsmæssige og velfærdsmæssige konsekvenser i besætningerne. Det øgede fokus på influenzavirus som årsag til kliniske symptomer har i henhold til VETSTAT medført en kraftig stigning i antallet af solgte vaccinedoser mod influenza A virus til svin. Alt andet lige vil den øgede diagnostik sammenholdt med øget forebyggelse ved vaccination bidrage til at nedbringe forbruget af antibiotika til behandling af respirationsvejslidelser i svinebesætningerne.

Den kommercielt tilgængelige vaccine på det danske marked har begrænset krydsbeskyttelse mod infektion med den ”pandemiske” subtype H1N1pdm09. Fra 2012 har det derfor været muligt at få dispensation til at anvende en vaccine, der specifikt beskytter mod H1N1pdm09 virus, men kun hvis denne type er påvist i besætningen. Da alle positive influenza prøver testes for H1pdm09 subtypen, bidrager overvågningen til, at der kan forebygges mere effektivt mod svineinfluenza, da den rigtige vaccine kan vælges. Salget af vaccinen mod H1N1pdm09 virus er således også steget kraftigt de senere år.

Under overvågningen i 2015 har vi genfundet alle de reassortments, som tidligere er fundet i Danmark, så det ser ud til at nye reassortments med tiden bliver etableret i den danske svinepopulation. Overvågningen fungerer hensigtsmæssigt med henblik på at identificere influenzavirus med nye gensammensætninger hurtigt, selvom stikprøvestørrelsen, set i forhold til den samlede population af svin, er begrænset. Hovedparten af de identificerede nye subtyper har HA subtypevarianter, der allerede cirkulerer i Danmark, hvorfor en vis populationsimmunitet er til stede. Det forventes derfor ikke, at disse nye subtyper spredes meget hurtigt, og der er heller ikke rapporter fra felten om, at de giver mere alvorlige kliniske symptomer. En undtagelse fra dette er den nye subtype med et human-like H3 (H3hu05N2sw), som det må formodes at danske grise ikke har god immunitet imod. Derudover har den tilgængelige vaccine ingen beskyttelse mod H3hu05, og det var netop manglende effekt af vaccination i smittede besætninger, der henledte opmærksomheden på dette virus. Det må formodes at danske og udenlandske svinebesætninger er totalt naive overfor dette virus.

Zoonotiske aspekter

I USA er der rapporteret om mere end 340 tilfælde i perioden 2011-2015 af human infektion med et svineinflenzavirus af subtypen H3N2, som har optaget et pandemisk M gen, dette virus kaldes H3N2v ifølge international nomenklatur. I 2015 har der kun været rapporteret tre tilfælde. Der er fra europæisk side stor fokus på at overvåge, om dette virus spredes til mennesker eller svin i Europa

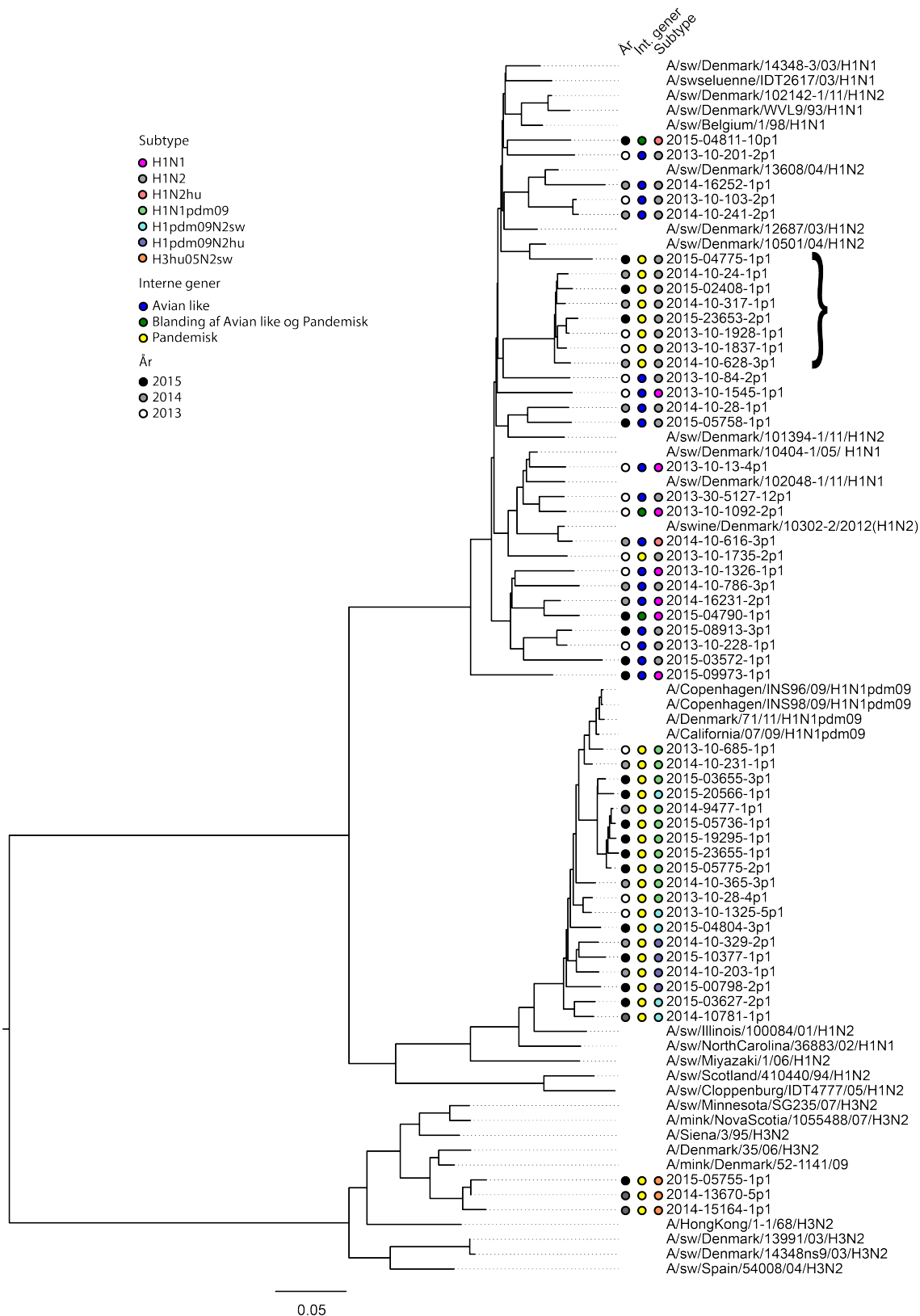
(<http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Scientific-opinion-risk-swine-origin-influenza-A%28H3N2%29-EFSA-EMA.pdf>). På baggrund af den overvågning der er foretaget i Danmark i 2010-15, kan det konkluderes, at det er meget usandsynligt at dette virus

er til stede i den danske svinepopulation. Det nye reassortment H3hu05N2sw, med interne H1N1pdm09 gener, minder i sammensætning om det amerikanske H3N2v, der også har et pandemisk M gen, men da H3 fra H3hu05N2sw har cirkuleret i den danske og globale humane population i mange år, må man formode, at der er en god immunitet mod dette virus, hvilket vil reducere omfanget af smittede, hvis dette virus skulle smitte til mennesker.

Der blev i 2015 igen påvist en reassortment, H1N2hu, som har et N2 gen, der er tæt beslægtet med humane H3N2 influenzavirus, der cirkulerede i mennesker midt i 90'erne. Dette virus er også påvist i 2011 – 2014. Virus, der er meget tæt beslægtet med dette virus, er endvidere fundet i svin i Tyskland. Et andet virus fra 2011 med et lignende humant N2 gen, H1pdmN2hu, er også påvist i 2014. SSI er orienteret om disse fund, men fundene giver ikke anledning til stor bekymring, da der ikke er forhold, der tyder på at disse virus har zoonotisk potentiale, på trods af at de indeholder et human-adapteret N2 gen.

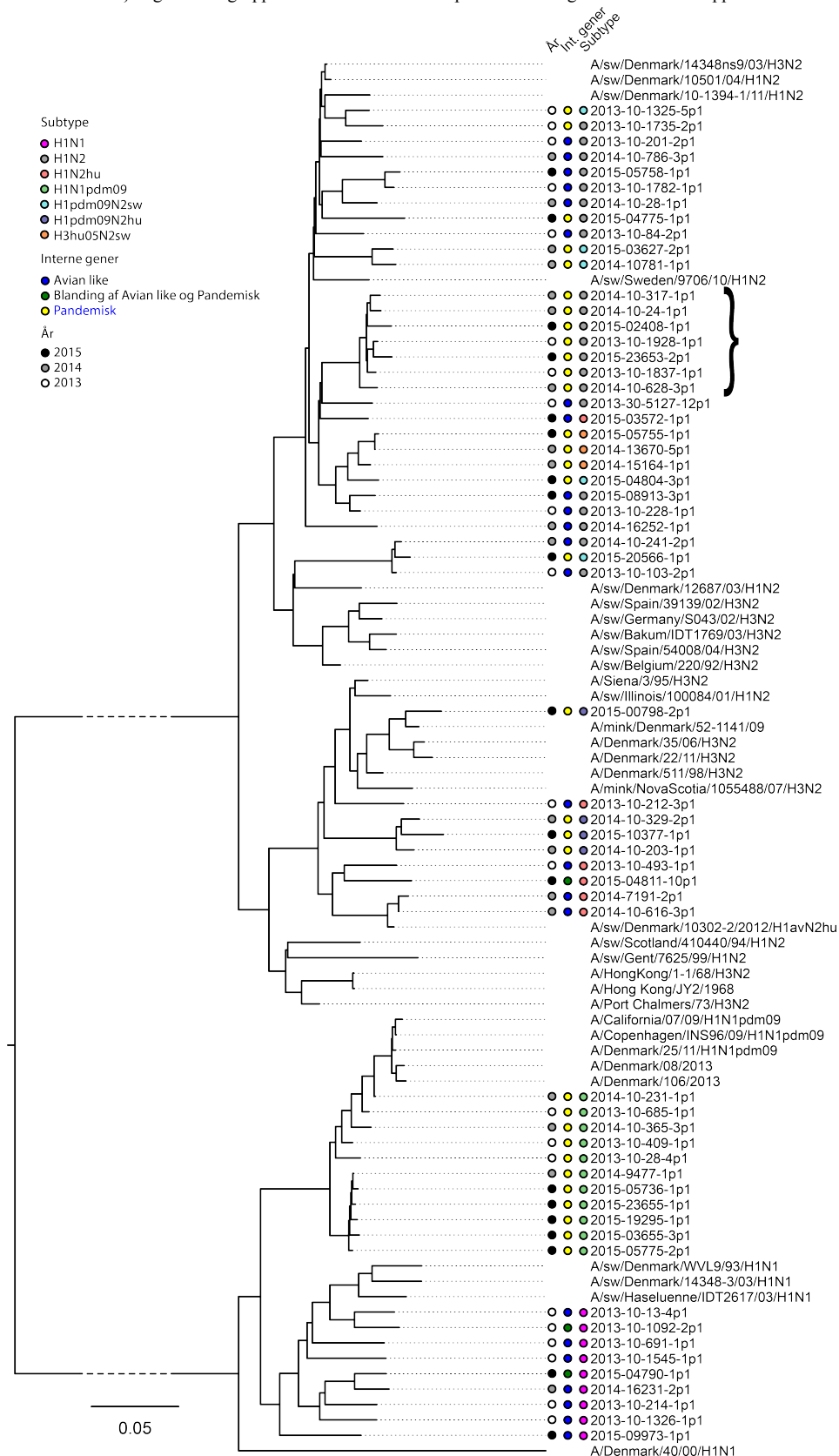
Bilag 1. HA fylogeni

Fylogenetisk træ af fuld længde HA gen fra fuld genom karakteriserede isolater fra overvågningen i 2015/14/13 baseret på MUSCLE alignment og neighbor-joining fylogeni. Navne startende med årstal er prøver fra overvågningen 2015/14/13 de øvrige er referencer fra tidligere danske prøver eller GenBank. } angiver den gruppe af H1N2 der har H1N1pdm09 interne gener beskrives i rapporten side 13.



Bilag 2. NA fylogeni

Fylogenetisk træ af fuld længde NA gen baseret på MUSCLE alignment and neighbor-joining fylogeni træ, fra fuldgenom karakteriserede isolater fra overvågningen i 2015/14/13. Navne startende med årstal er prøver fra overvågningen 2015/14/13 de øvrige er referencer fra tidligere danske prøver eller GenBank. } angiver den gruppe af H1N2 der har H1N1pdm09 interne gener beskrives i rapporten side 13.



Bilag 3. Fuld genom data

Skematisk præsentation af oprindelsen af alle otte segmenter fra de undersøgte isolater fra 2012-2015. Hvert gensegment er farvekodet i henhold til deres oprindelse. Blå: Svineinfluenza af subtyperne H1N1, H1N2 og H3N2. Rød: Humane H3N2 der har cirkuleret for nylig. Grøn: H1N1pdm09, Hvid: Sekventering har ikke været mulig

	H1	H3	N1	N2	M	NP	NS	PA	PB1	PB2
H1N1										
2012-10-85-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2012-10-146-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2012-10-169-3p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2012-10-235-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2012-10-363-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2012-10-1143-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2012-10-1245-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2013-10-13-4p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2013-10-214-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2013-10-691-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	White	Blue
2013-10-1092-2p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Green	Blue	Blue	Blue	Blue
2013-10-1326-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2013-10-1545-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2014-16231-3p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	White	Blue	Blue	Blue	Blue
2015-4790-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Green	Green	Green	Green	Green
2015-09973-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
H1N2										
2012-10-258-1p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2012-10-297-1p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2012-10-345-1p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2012-10-448-3p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2012-10-779-2p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Green	Green
2012-10-789-1p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2012-10-801-2p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Green	Green
2012-10-802-1p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Green	Green
2012-10-1844-3p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Green	Green	Green	Green
2013-10-84-2p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2013-10-103-2p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	White	Blue
2013-10-201-2p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2013-10-228-1p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2013-30-5127-12p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2013-10-1782-1p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2013-10-1735-2p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Green	Green	Green	Green	Green
2013-10-1837-1p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Green	Green	Green	Green	Green
2013-10-1928-1p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Green	Green	Green	Green	Green
2014-10-24-1p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Green	Green	Green	Green	Green
2014-10-28-1p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	White	Blue
2014-10-241-1p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2014-10-317-1p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Green	Green	Green	Green	Green
2014-10-628-3p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Green	Green	Green	Green	Green
2014-10-786-3p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2014-16252-1p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	White	Blue
2015-02408-1p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Green	Green	Green	Green	Green
2015-03572-1p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2015-04775-1p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Green	Green	Green	Green	Green
2015-05758-1p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2015-08913-3p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2015-23653-2p1	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Green	Green	Green	Green	Green

H1N1pdm09										
2012-10-162-1p1										
2013-10-28-4p1										
2013-10-409-1p1										
2013-10-685-1p1										
2014-10-231-1p1										
2014-10-365-3p1										
2014-9477-1p1										
2015-03655-3p1										
2015-05736-1p1										
2015-05775-2p1										
2015-19295-1p1										
2015-23655-1p1										
H1N2hu										
2012-10-302-2p1										
2013-10-212-3p1										
2013-10-493-1p1										
2014-10-616-3p1										
2014-7191-2p1										
2015-04811-10p1										
H1pdm09N2sw										
2012-10-176-1p1										
2012-10-845-1p1										
2013-10-1325-5p1										
2014-6252-2p1										
2014-10781-1p1										
2015-03627-2p1										
2015-04804-3p1										
2015-20566-1p1										
H1pdm09N2hu										
2014-10-203-1p1										
2014-10-329-2p1										
2015-00798-2p1										
2015-10377-1p1										
H3hu05N2sw										
2014-15164-1p1										
2015-05755-1p1										
Farvekode										
Svineinfluenza (H1N1, H1N2, H3N2) oprindelse						H1N1pdm09 oprindelse				
Nylige humane H3N2						Ikke sekventeret				

Bilag 4. Geografisk fordeling af positive og negative indsendelser

ANONYMT

Bilag 5. Geografisk fordeling af H1N1pdm09 virus

ANONYMT

Bilag 6. Geografisk fordeling af subtyper

ANONYMT